

**New flavone or isoflavone glycoside polyunsaturated or araliphatic ester derivatives, useful in cosmetic, pharmaceutical, food or feed compositions, e.g. for treating sunlight-induced skin aging**

**Patent Number : WO200179245**

*International patents classification : A61K-007/42 C07H-017/04 C07H-017/07 A23K-001/16 A23L-001/03 A23L-001/30 A23L-003/3544 A61K-007/00 A61K-007/48 A61K-031/7048 A61P-017/16 C12P-007/62 C12P-019/44 C12P-019/60*

**• Abstract :**

WO200179245 A NOVELTY - Flavone or isoflavone glycoside polyunsaturated or araliphatic ester derivatives (I) are new.

DETAILED DESCRIPTION - Flavone or isoflavone glycoside derivatives of formula (I) are new.

(X-O-Z') = (iso)flavone basic structure;

X = (iso)flavone basic structure of formula (a) or (b), which is mono- or polysubstituted and/or mono- or poly-reduced (hydrogenated);

Z' = mono-, di- or polysaccharide, having an acetal bond to X and substituted by n A2-containing ester groups;

A1C(O) = acyl group bonded to X;

A2C(O) = acyl group bonded to Z';

A1, A2 = polyunsaturated 15-25C alkenyl, containing at least 4 isolated and/or at least 2 conjugated double bonds; or araliphatic group containing 1-4 methylene groups between the ester group and the aromatic ring;

n = integer (not zero);

m = 0 or integer;

R1-R3 = H or OH.

An INDEPENDENT CLAIM is included for the preparation of (I).

ACTIVITY - Dermatological; antidiabetic; vasotropic; ophthalmological; antiarteriosclerotic, prostaglandin; antiinflammatory; thrombolytic; hypotensive.

MECHANISM OF ACTION - Oxygen radical scavenger; antioxidant; protease inhibitor; aldose reductase inhibitor; prostaglandin synthesis inhibitor; leukotriene synthesis inhibitor; collagenase inhibitor; tyrosinase inhibitor. 6-O-Naringin-(3-phenyl-propionic acid) ester (Ia) had IC50 0.18% for inhibition of tyrosinase.

USE - (I) show a combination of the activities of the (iso)flavone glycoside components (e.g. oxygen radical scavenging, antioxidant, skin protease inhibiting, anti-skin aging and scarring, colorant, aldose reductase inhibiting, anti-diabetic vascular damage or cataract, vasodilatory or capillary activity) and those of the acid component (e.g. anti-arteriosclerotic, prostaglandin- and leukotriene synthesis inhibiting, antiinflammatory, thrombolytic or hypotensive activity). (I) may be used in cosmetic, pharmaceutical, food or feed compositions (claimed). In particular (I) inhibit matrix metalloprotease-1 (MMP-1; collagenase) and tyrosinase, and are used (claimed) for the cosmetic treatment of sunlight-induced aging of human skin or for cosmetic skin lightening.

ADVANTAGE - (I) show higher bioavailability, stronger activity, a broader spectrum of activity, reduced side-effects (e.g. phototoxicity), better resorbability and/or more rapid skin penetration compared with the parent compounds or related known compounds. (Dwg.0/0)

**• Publication data :**

Patent Family : WO200179245 A1 20011025 DW2002-01 C07H-017/07 Ger 36p \* AP: 2001WO-EP04151 20010411 DSNW: AU BG BR BY CA CN CZ DZ HU ID IL IN JP KR MX NO NZ PL RO RU SG SI SK UA US UZ VN YU ZA DSRW: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR DE10019235 A1 20011031 DW2002-01 C07H-017/04 AP: 2000DE-1019235 20000418 AU200150423 A 20011030 DW2002-19 C07H-017/07 FD: Based on WO200179245 AP: 2001AU-0050423 20010411 EPI274712 A1 20030115 DW2003-06 C07H-017/07 Ger FD: Based on WO200179245 AP: 2001EP-0923722 20010411; 2001WO-EP04151 20010411 DSR: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT RO SE SI TR

**US20030170186** A1 20030911 DW2003-67 A61K-

007/42 AP: 2001WO-EP04151 20010411; 2003US-0258049

20030424

JP2004501086 W 20040115 DW2004-10 C07H-017/07 57p FD:

Based on WO200179245 AP: 2001JP-0576843 20010411;

2001WO-EP04151 20010411

Priority n° : 2000DE-1019235 20000418

Covered countries : 49

Publications count : 6

**• Accession codes :**

Accession N° : 2002-011118 [01]  
Sec. Acc. n° CPI : C2002-002830

**• Derwent codes :**

Manual code : CPI: B06-A01 B14-C03  
B14-D05D B14-D07C B14-E11 B14-F02B  
B14-F02D B14-F04 B14-F07 B14-L08  
B14-N03 B14-N17 B14-R01 B14-S04 B14-  
S08 D03-H01T D05-A02C D05-C08 D05-  
C09 D05-C15 D08-B09A1 D08-B09A3  
E06-A01 E11-F06 E11-M  
Derwent Classes : B03 D13 D16 D21 E13  
Compound Numbers : RA79DL-T

**• Update codes :**

Basic update code : 2002-01  
Equiv. update code : 2002-01; 2002-19;  
2003-06; 2003-67; 2004-10

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

RA79DL-N RA79DL-P 0052-29001-T  
0052-29001-N 0052-29001-P RA79DL-T  
RA79DL-N RA79DL-P 0052-29001-T  
0052-29001-N 0052-29001-P

**Others :**

**Technology Abstract**

**TECHNOLOGY FOCUS**

**ORGANIC CHEMISTRY - Preparation:**  
Claimed preparation of (I) involves esterification or transesterification of an acetal X-O-Z' (in which the (iso)flavone structure is optionally in the form of a mixture derived from plant extracts) with acid(s) A1COOH/A1COOH (or corresponding esters or activated derivatives) under enzymatic catalysis. Specifically the acid is a conjugated linoleic acid and the enzymatic catalyst consists of hydrolase(s), preferably derived from *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus arrhizus* or *Mucor miehei*, especially the lipase (isoenzyme B) from *Candida antarctica*. The reaction mixture is preferably purified by 2-phase extraction using water and an organic solvent (e.g. n-hexane, cyclohexane, tetrahydrofuran or diethyl ether) or by chromatography on silica gel (preferably using ethyl acetate/methanol or dichloromethane mixtures containing a small amount of acetic acid and/or water).

**Keyword Index Terms** [I] 550711-1-0-0-CL; 550711-1-0-0-NEW; 550711-1-0-0-PRD; 0052-29001-CL; 0052-29001-NEW; 0052-29001-PRD

**UP4** 2002-01

**UE4** 2002-01; 2002-03; 2003-01; 2003-10; 2004-02

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
25. Oktober 2001 (25.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/79245 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07H 17/07**, (30) Angaben zur Priorität:  
A61K 7/42, 31/7048, A23L 3/3544, C12P 7/62, 19/44 100 19 235.1 18. April 2000 (18.04.2000) DE

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/04151** (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN [DE/DE]**; Henkelstr. 67, 40589 Düsseldorf (DE). **COGNIS DEUTSCHLAND GMBH [DE/DE]**; Henkelstr. 67, 40589 Düsseldorf (DE).

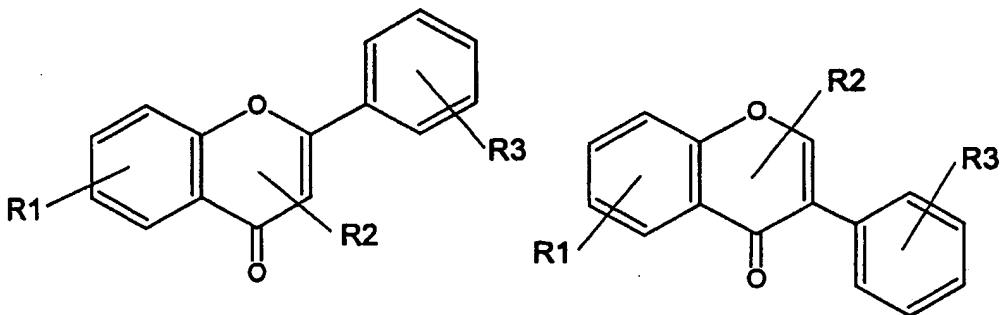
(22) Internationales Anmelddatum:  
11. April 2001 (11.04.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch (72) Erfinder; und  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **OTTO, Ralf [DE/DE]**; Oedheimer Str. 6, 74177 Bad Friedrichshall (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NOVEL FLAVONE GLYCOSIDE DERIVATIVES FOR USE IN COSMETICS, PHARMACEUTICALS AND NUTRITION

(54) Bezeichnung: NEUE FLAVONGLYKOSID-DERivate FÜR DEN EINSATZ IN KOSMETIKA, PHARMAZEUTIKA UND ERNÄHRUNG



(IIa)

(IIb)

(57) Abstract: The invention relates to flavone and isoflavone glycoside derivatives of general formula (I):  $[A_1-C(=O)O]_m-[X-O-Z]-[O-C(=O)-A_2]_n$  (I), wherein  $[X-O-Z]$  represents a flavone or isoflavone glycoside structure, wherein X represents a flavone or isoflavone parent substance of formula (IIa) or (IIb), said (iso)flavone parent substance being mono- or multisubstituted and/or mono- or multireduced (hydrogenated), wherein Z (sugar) represents a mono-, di- or polysaccharide which is acetally bonded to the radical X and is ester-substituted with  $A_2$  n-times,  $[A_1-C(=O)]$  representing an acyl radical on the flavone or isoflavone parent substance, wherein  $A_1$  and  $A_2$ , independently of each other, represent a polyunsaturated  $C_{15}$ - $C_{25}$ -alkenyl radical with at least 4 isolated and/or at least 2 conjugated double bonds or an arylaliphatic radical with 1-4 methylene groups between the ester group and the aromatic ring, wherein  $[C(=O)A_2]$  represents an acyl radical on the sugar Z, wherein n is a whole number (1, 2, 3, ...) but not 0, wherein m is a whole number including 0 (0, 1, 2, 3, ...) and wherein R1, R2 and R3 represent hydroxyl groups or hydrogen atoms.

(57) Zusammenfassung: Flavon- und Isoflavonglykosid-Derivate der allgemeinen Formel (I):  $[A_1-C(=O)O]_m-[X-O-Z]-[O-C(=O)-A_2]_n$  (I), worin  $[X-O-Z]$  eine Flavon- oder Isoflavonglykosid-Struktur darstellt, worin X einen Flavon- oder Isoflavongrundkörper der Formel (IIa) bzw. (IIb) darstellt, wobei der (Iso-)Flavongrundkörper einfach oder mehrfach substituiert und/oder einfach oder mehrfach reduziert (hydriert) ist, worin Z (Zucker) für ein Mono-, Disaccharid oder Polysaccharid steht, das acetalisch an den Rest X gebunden und n-fach esterartig mit  $A_2$  substituiert ist, worin  $[A_1-C(=O)]$  einen Acylrest am Flavon- oder Isoflavongrundkörper darstellt, worin  $A_1$

**WO 01/79245 A1**

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



GEERS, Bernadette [DE/DE]; Konkordiastr. 60, 40219 Düsseldorf (DE). WEISS, Albrecht [DE/DE]; Forellengweg 37, 40764 Langenfeld (DE). PETERSOHN, Dirk [DE/DE]; Uferstrasse 48, 50996 Köln (DE). SCHLOTMANN, Kordula [DE/DE]; Christophstr. 46, 40225 Düsseldorf (DE). SCHRÖDER, Klaus, Rudolf [DE/DE]; Stintenbergerstr. 11a, 40822 Mettmann (DE).

(74) Anwalt: HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN; Patente (VTP), 40191 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, DZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, UA, US, UZ, VN, YU, ZA.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

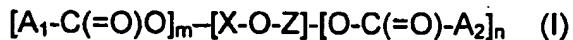
---

und A<sub>2</sub> unabhängig voneinander einen mehrfach ungesättigten C<sub>15</sub>- C<sub>25</sub>-Alkenylrest mit mindestens 4 isolierten und/oder mindestens zwei konjugierten Doppelbindungen oder einen arylaliphatischen Rest mit 1-4 Methylengruppen zwischen Ester-Gruppe und aromatischem Ring darstellen, worin [C(=O)A<sub>2</sub>] einen Acylrest am Zucker Z darstellt, worin n eine ganze Zahl (1, 2, 3, ...), nicht aber 0 ist, worin m eine ganze Zahl einschliesslich 0 (0, 1, 2, 3, ...) ist, und worin R1, R2, R3 Hydroxylgruppen oder Wasserstoff-Atome darstellen.

**Neue Flavonglykosid-Derivate  
für den Einsatz in Kosmetika, Pharmazeutika und Ernährung**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft neue, biologisch aktive Flavon- und Isoflavonglykosid-Derivate der allgemeinen Formel (I)



von aliphatischen und arylaliphatischen Carbonsäuren, Verfahren zu ihrer Herstellung  
10 und diese Verbindungen enthaltende kosmetische und/oder pharmazeutische Zubereitungen, ebenso wie deren Einsatz als Zusatzstoffe in der Ernährung und in Futtermitteln.

15 In der Kosmetik wird die Anwendung von Wirkstoffen immer wichtiger. Bei den Wirkstoffen, die bisher bereits Anwendung in der Kosmetik finden, handelt es sich nicht immer um Naturstoffe. Die Optimierung bekannter Wirkstoffe und die Herstellung neuer Wirkstoffe sind Gegenstand vieler Forschungsarbeiten.

20 Im weitesten Sinne sind Wirkstoffe solche Stoffe, die – in relativ kleinen Mengen vorkommend oder zugeführt – große physiologische Wirkung entfalten können. Hier ist an Hormone, Vitamine, Enzyme, Spurenelemente etc. zu denken, aber auch an Pharmaka (Arzneistoffe), Futterzusätze, Düngemittel und Schädlingsbekämpfungsmittel. Nicht selten kann man auch Synergismus beobachten.

25 Flavone und Isoflavone/Flavonoide und Isoflavonoide bzw. Flavonglykoside und Isoflavon-glykoside

Flavone sind 2-Phenyl-4H-1-benzopyran-4-one, bei denen an verschiedenen Positionen der Ringe Hydroxylgruppen vorliegen oder auch fehlen können. Ein Beispiel für ein Flavon ist Apigenin, dessen chemischer Name 2-(p-Hydroxyphenyl)-4H-1-(5,7-30 dihydroxybenzopyran-4-on lautet (siehe Römpf Chemie-Lexikon, 9. Auflage, Band 2, S. 1373/4). Die zusätzlichen Hydroxylgruppen sitzen dabei, wie das genannte Beispiel zeigt, an dem Phenyl- und/oder dem Benzopyranring. Anders ausgedrückt: im Sinne der vorliegenden Erfindung sind unter Flavonen Stoffe zu verstehen, die Hydrierungs-,

Oxidations- oder Substitutionsprodukte des 2-Phenyl-4H-1-benzopyran-4-ons darstellen, wobei eine Hydrierung in der 2,3-Stellung des Kohlenstoffgerüsts erfolgen kann, und wobei unter Substitution der Ersatz eines oder mehrerer Wasserstoffatome durch Hydroxy- oder Methoxy-Gruppen zu verstehen ist. Bei dieser Definition sind also

5 Flavane, Flavan-3-ole (Catechine), Flavan-3,4-diole (Leukoanthocyanidine), Flavone, Flavonole und Flavanone im herkömmlichen Sinn eingeschlossen. Zu den erfindungsgemäßen Flavonen zählen neben Apigenin beispielsweise Chrysin, Galangin, Fisetin, Luteolin, Kämpferol, Quercetin, Morin, Robinetin, Gossypetin, Taxifolin, Myricetin, Rhamnetin, Isorhamnetin, Naringenin, Eriodyctiol, Hesperetin, Liquiritigenin,

10 Catechin und Epicatechin.

Unter Isoflavonen sind im Sinne der vorliegenden Erfindung hingegen solche Stoffe zu verstehen, die Hydrierungs-, Oxidations- oder Substitutionsprodukte des 3-Phenyl-4H-1-benzopyran-4-ons darstellen, wobei eine Hydrierung in der 2,3-Stellung des Kohlenstoffgerüsts erfolgen kann, und wobei unter Substitution der Ersatz eines oder mehrerer Wasserstoffatome durch Hydroxy- oder Methoxy-Gruppen zu verstehen ist. Zu den erfindungsgemäßen Isoflavonen zählen beispielsweise Daidzein, Genistein, Prunetin, Biochanin, Orobol, Santal, Pratensein, Irigenin, Glycitein, Biochanin A und Formononetin.

20 Flavone und Flavonglykoside (Flavonoide) wie Asparatin, Orientin (Lutexin), Cisorientin (Lutonaretin), Isoquercitin, Rutin, Naringin und die oben genannten, aber auch Isoflavone und Isoflavonglykoside (Isoflavonoide) sind bekanntermaßen Fänger von Sauerstoffradikalen sowie Hemmer von Proteasen der Haut, wodurch sie aktiv der Alterung der Haut und Vernarbungen entgegenwirken können. Wegen ihrer färberischen Eigenschaften sind einige Flavone wie Quercetin als Lebensmittelfarbstoffe in Gebrauch. Gleichzeitig wirken sie auf Grund ihrer Fähigkeit, Sauerstoffradikale einzufangen, auch als Antioxidantien. Einige Flavonoide sind Inhibitoren der Aldose-Reduktase. Diese spielt bei der Entstehung von

25 Diabetesschäden (Gefäßschäden, Grauer Star) eine entscheidende Rolle. Andere Flavonoide (wie Hesperidin und Rutin) finden therapeutische Verwendung insbesondere als gefäßweiterende, kapillaraktive Mittel.

30

Die erfindungsgemäß durchgeführten Derivatisierungen erzielen eine verbesserte Wirkung sowie eine erhöhte Bioverfügbarkeit, wie es bereits früher am Beispiel von Salicinderivaten gezeigt wurde.

5

Viele natürlich vorkommende Alkyl- und Phenol-Glucoside zeigen antivirale, antimikrobielle und teilweise antiinflammatorische Wirkungen. Sie sind jedoch oft aufgrund ihrer Polarität wenig bioverfügbar bzw. ihre Selektivität ist zu gering. Beispielsweise ist Salicin (ein glykosidischer Wirkstoff aus der Weidenrinde) ein 10 nichtsteroidales antiinflammatorisches Agens (NSAIA), das nach Derivatisierung (Veresterungen) deutlich verbesserte Wirksamkeit zeigt. Kürzlich gelang die Synthese neuer arylaliphatischer Salicinester wie Phenylacetoyl-Salicin oder Phenylbutyroyl-Salicin, wobei die Veresterung bevorzugt an den primären OH-Gruppen des Salicins (zunächst am Zucker, dann am Benzylrest) im Salicin erfolgte. Aufgrund des 15 arylaliphatischen Restes wird der Stofftransport an den Wirkort verbessert und die Selektivität der Wirkung erhöht. So inhibieren diese Derivate im Gegensatz zu unmodifiziertem Salicin bevorzugt die Prostaglandinsynthase 2 (geringere Gefahr von Nebenwirkungen) (Ralf T. Otto, Biotechnologische Herstellung und Charakterisierung neuer pharmazeutisch aktiver Glykolipide, Dissertation (1999) ISBN 3-86186-258-1).

20

#### PUFAs und CLAs

Die PUFAs (engl. polyunsaturated fatty acids) und CLAs (conjugated linoleic acids) gehören in der Ernährung zu der Gruppe der essentiellen Fettsäuren und zeigen zusätzlich eine positive Wirkung beim Einsatz in der Prophylaxe von Arteriosklerose.

25 Daneben sind auch pharmazeutische Effekte von Bedeutung: Sie können antiinflammatorische (Hemmung der Prostaglandin- bzw. Leukotriensynthese), aber auch eine thrombolytische und hypotensive Wirkung aufweisen.

Erfindungsgemäß wird PUFA definiert als eine mehrfach ungesättigte Fettsäure mit 16 30 bis 26 C-Atomen, wobei die Fettsäure mindestens vier isolierte und/oder mindestens zwei konjugierte Doppelbindungen aufweist. Beispiele für PUFAs sind die insgesamt zwölf zur Linolsäure (cis, cis, 9,12-Octadecadiensäure) isomeren Octadecadiensäuren

(die in der Natur vorkommen), die über konjugierte Doppelbindungen an den C-Atomen 9 und 11, 10 und 12, oder 11 und 13 verfügen.

Diese Isomeren der Linolsäure (z.B. cis, trans, 9,11-Octadecadiensäure, trans, cis, 5 10,12-Octa-decadiensäure, cis, cis, 9,11-Octadecadiensäure, trans, cis, 9,11-Octadecadiensäure, trans, trans, 9,11-Octadecadiensäure, cis, cis, 10,12-Octadecadiensäure, cis, trans, 10,12-Octadecadiensäure, trans, trans, 10,12-Octadecadiensäure) lassen sich auf herkömmlichem Weg mittels chemischer Isomerisierung der Linolsäure herstellen, wobei diese Reaktionen in Abhängigkeit der 10 Reaktionsbedingungen ausschließlich zu CLA-Gemischen unterschiedlichster Zusammensetzung führen (z.B. Edenor UKD 6010, Henkel KGaA).

Aufgrund ihrer konjugierten Doppelbindungen werden diese isomeren Octadecadiensäuren auch als "*conjugated linoleic acids*" (CLAs) bezeichnet.

15 Obwohl in der Literatur bereits zahlreiche pharmakologisch wirksame Stoffe beschrieben sind, die beispielsweise in die Entzündungskaskade eingreifen, besteht weiterhin ein Bedarf an besser wirksamen, an Nebenwirkungen armen Wirkstoffen. Weiter besteht ein Bedarf an Wirkstoffen mit einer guten Resorbierbarkeit und einer schnellen Penetration in die Haut, die zudem gut in pharmazeutische oder kosmetische 20 Formulierungen einarbeitbar sein müssen.

Weiterhin besteht ein besonderes Interesse an der Auffindung von Wirkstoffen, welche den Alterungsprozessen der menschlichen Haut vorbeugen können.

25 Die menschliche Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie ist ein sehr komplex aufgebautes Organ, welches aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen besteht und die Grenzfläche des Körpers zur Umwelt bildet. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die Zellen der Haut in besonderem Maße exogenen Signalen der Umwelt, physikalischer und chemischer Natur ausgesetzt. Viele dieser exogenen Noxen 30 tragen zum Alterungsprozeß der Haut bei.

Die makroskopischen Phänomene alternder Haut beruhen zum einen auf der intrinsischen oder chronologischen Alterung, zum anderen auf der extrinsischen Alterung durch Umweltstress. Die Fähigkeit lebender Hautzellen, auf Ihre Umwelt zu

reagieren, verändert sich mit der Zeit. Es finden Alterungsprozesse statt, die zur Seneszenz und letztendlich zum Zelltod führen. Die sichtbaren Zeichen gealterter Haut sind als Integral der intrinsischen und der extrinsischen Alterung (z.B. durch Sonnenlicht) zu verstehen, wobei die Ereignisse der extrinsischen Alterung über einen längeren Zeitraum in der Haut akkumulieren.

Exogene Signale werden von Zellen empfangen und führen, zum Teil über komplexe Signaltransduktionskaskaden, zu Veränderungen im Genexpressionsmuster. Auf diese Weise reagiert jede Zelle auf Signale aus ihrer Umgebung mit der Anpassung ihres Metabolismus. Z.B. bemerken die Zellen der Haut die energiereiche Strahlung der Sonne und reagieren darauf mit der Umstellung ihrer RNA- und Proteinsyntheseleistungen. Einige Moleküle werden nach einem Stressstimulus (z.B. Sonnenlicht) vermehrt synthetisiert (z.B. die Kollagenase MMP-1), andere wiederum werden in einem geringeren Umfang produziert (z.B. Kollagen<sub>1</sub>). Weiterhin wird bei einer Vielzahl der Syntheseprozesse keine signifikante Veränderung erfolgen (z.B. TIMP-1).

Die Induktion der Kollagenase MMP-1 durch Sonnenlicht oder andere Stressfaktoren wird als Hauptursache für den Prozess der extrinsischen Hautalterung angesehen. Die Kollagenase MMP-1 zerstört den wichtigsten Bestandteil des Bindegewebes der Haut, das Kollagen, und führt dadurch unter anderem zu einer Reduktion der Hautelastizität und zur Ausbildung tiefer Falten. In der jungen und nicht gestressten Haut wird die Aktivität der Kollagenase durch einen natürlich vorkommenden Inhibitor TIMP-1 (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloprotease-1) reguliert. Zwischen MMP-1 und TIMP-1 besteht ein äußerst sensibles Gleichgewicht, welches durch exogenen Stress empfindlich gestört wird. Die Expression von MMP-1 wird durch Hautstress, wie z.B. die Bestrahlung mit Sonnenlicht verstärkt. Demgegenüber wird die Synthese des Inhibitors TIMP-1 nicht signifikant verändert. Daher kommt es unter Einwirkung von exogenem Stress, wie z.B. Sonnenlicht, in der Haut zu einem übermäßigen Abbau von Kollagen. Die Folge ist eine vorzeitige Alterung der Haut.

30

Bestrebungen zur kosmetischen Behandlung der Effekte einer stressinduzierten Hautalterung haben die Reduktion der MMP-1-Aktivität oder die verstärkte Synthese von Kollagen zum Ziel. Durch die Verwendung von Retinsäure bzw. Retinol soll die MMP-1

Synthese in der Haut vermindert oder die Kollagensynthese verstört werden. Jedoch ist der Einsatz von Retinsäure für Kosmetika in Europa aufgrund teratogener Eigenschaften nicht gestattet. Zytotoxische Effekte, unzureichende Stabilität in Formulierungen, unerwünschte Nebenwirkungen oder auch die störende Eigenfarbe 5 fren zur Limitierung der kosmetischen Verwendung von Wirkstoffen, wie z.B. bei alpha-Tocopherol, Propylgallat oder diversen Pflanzenextrakten.

Die Aufgabe, die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegt, bestand also darin, nebenwirkungsarme, gut wirkende und gut zu verarbeitende und zu applizierende 10 Substanzen bereitzustellen.

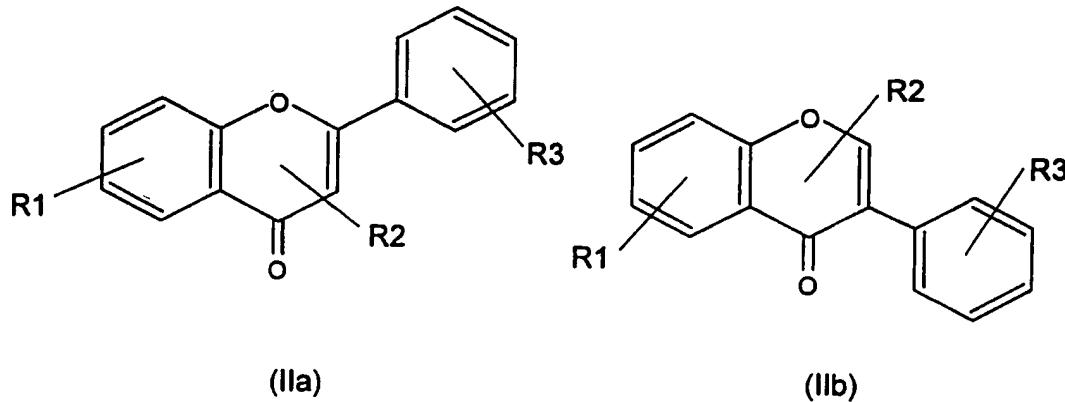
Flavon- und Isoflavonglykoside sind z.B. aus der Natur bekannt. Nicht bekannt (weder aus Pflanzen, Mikroorganismen oder tierischen Zellen noch synthetisch hergestellt) sind hingegen Ester solcher Flavon- und Isoflavonglykoside, bei denen mindestens eine der 15 Hydroxylgruppen des Zuckers mit einer (ungestigten) Carbon- bzw. Fettsäure verestert ist, und bei denen weiterhin eventuell eine weitere Estergruppierung zwischen einer der Hydroxylgruppen des Flavon- oder Isoflavon-Anteils und einer weiteren ungestigten Fettsäure vorliegt.

20 Überraschenderweise wurde von den Erfindern gefunden, daß bestimmte Flavon- und Isoflavonglykosid-Ester eine gegener den bekannten Einzelkomponenten (Fettsäure bzw. (Iso-) Flavonglykosid) verbesserte biologische Verfigbarkeit, verstärkte Wirkung und/oder ein verbreiterter Wirksppektrum aufweisen. Bei diesen (Iso-)Flavon-Glykosid-Derivaten sind die Flavone oder Isoflavone 25 über mindestens eine Hydroxylgruppe mit mindestens einem Zucker glykosidisch verknüpft. Dabei kann der Zucker über eine OH-Gruppe am Benzopyran-Ring oder über eine OH-Gruppe am Phenylring des (Iso-)Flavonrestes mit diesem verknüpft sein. Auch die Gruppierung [A<sub>1</sub>-C(=O)] kann über eine OH-Gruppe am Benzopyran-Ring oder über eine OH-Gruppe am Phenylring des (Iso-)Flavonrestes mit diesem verknüpft sein. Es ist bevorzugt, wenn der Zucker über 30 den Benzopyran-Ring und die Fett-/Carbonsäure ebenfalls über den Benzopyran-Ring oder über den Phenylring des (Iso-)Flavonrestes mit diesem verknüpft ist.

Als Zucker kommen Mono- und Oligosaccharide, insbesondere D-Glucose, D-Galactose, D-Xylose, D-Apiose, L-Rhamnose, L-Arabinose und Rutinose in Betracht. Beispiele für die Flavon-Glykosid-Reste in den erfindungsgemäßen Verbindungen sind Rutin, Hesperidin und Naringin. Bevorzugte Beispiele für die Isoflavon-Glykosid-Reste in den erfindungsgemäßen Verbindungen sind Daidzin und Genistin.

Durch die Bereitstellung der Verbindungen der vorliegenden Erfindung konnten die Erfinder die gestellte Aufgabe lösen.

10 Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind Flavon- und Isoflavonglykosid-Derivate der allgemeinen Formel (I):  
$$[A_1-C(=O)O]_m-[X-O-Z]-[O-C(=O)-A_2]_n \quad (I),$$
 worin  $[X-O-Z]$  eine Flavon- oder Isoflavonglykosid-Struktur darstellt, worin X einen Flavon- oder Isoflavongrundkörper der Formel (IIa) bzw. (IIb)



darstellt, wobei der (Iso-)Flavongrundkörper einfach oder mehrfach substituiert und/oder einfach oder mehrfach reduziert (hydriert) ist.

20 worin Z (Zucker) für ein Mono-, Disaccharid oder Polysaccharid steht, das acetalisch an den Rest X gebunden und n-fach esterartig mit A<sub>2</sub> substituiert ist.  
worin [A<sub>1</sub>-C(=O)] einen Acylrest am Flavon- oder Isoflavongrundkörper darstellt,  
worin A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> unabhängig voneinander einen mehrfach ungesättigten C<sub>15</sub> - C<sub>25</sub>-Alkenylrest mit mindestens 4 isolierten und/oder mindestens zwei konjugierten  
25 Doppelbindungen oder einen arylaliphatischen Rest mit 1-4 Methylengruppen zwischen Ester-Gruppe und aromatischem Ring darstellen.

worin  $[C(=O)A_2]$  einen Acylrest am Zucker Z darstellt,  
 worin n eine ganze Zahl (1, 2, 3, ...), nicht aber 0 ist,  
 worin m eine ganze Zahl (1, 2, 3, ...) einschließlich 0 ist, und  
 worin R1, R2, R3 Hydroxylgruppen oder Wasserstoff-Atome darstellen.

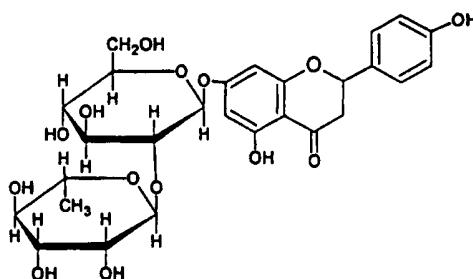
5

Bevorzugte Zuckeranteile sind allgemein solche Z, die ein Monosaccharid bedeuten.

Insbesondere bevorzugt sind folgende Monosaccharide: Rhamnose, Threose, Erythrose, Arabinose, Lyxose, Ribose, Xylose, Allose, Altrose, Galactose, Glucose, Gulose, Idose, Mannose, Talose und Fructose, wobei die natürlich vorkommenden

10 Stereoisomere der Zucker die jeweils bevorzugte Form ist. Ebenfalls bevorzugt sind Disaccharide, die aus den zuvor genannten Monosacchariden aufgebaut sind, wobei wiederum die natürlich vorkommenden Stereoisomere der Zucker die jeweils bevorzugte Form ist.

15 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bindung des (Iso-)Flavongrundkörpers an den Zucker über eine primäre Alkoholgruppe des Zuckers (z.B. über OH an C<sub>6</sub> der Glukose). Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist Z-O-X das Naringin-Gerüst mit der Formel (III)



20

(III)

Weitere bevorzugte Flavone/Flavonoide (X bzw. X-O-Z) in der allgemeinen Formel (I) sind Asparatin, Orientin (Lutixin), Cisorientin (Lutonaretin), Isoquercitin, Naringin, Rutin, Kämpferol und Quercetin handelt.

25

Bevorzugte Verbindungen der allgemeinen Formel (I) sind vor allem solche, bei denen X-O-Z Naringin gemäß Formel (III) ist, und A<sub>2</sub> die Acylreste folgender Säuren sind: p-

Chlorphenylessig-, Hydrozimt-, Stearin-, 12-Hydroxystearin-, Palmitin-, Laurin-, Öl-, Coumar-, Caprin-, Zimt-, 4-Phenylbutter-, 4-Hydroxyphenylessig-, 5-Phenylvaleriansäure oder die unter den Handelsnamen erhältlichen Gemische Edenor UKD 6010 und UKD 7505. Edenor UKD 6010 und UKD 7505, p-Chlorphenylessig- und Hydrozimtsäure sind besonders bevorzugte Säuren. Besonders bevorzugt ist für alle diese Kombinationen aus Naringin und den genannten Fettsäuren, wenn  $n=1$  oder  $n=2$  und  $m$  gleichzeitig 0 ist. Wenn  $n=1$  (und  $m=0$ ), ist die bevorzugte Position von  $A_2$  die primäre OH-Gruppe am Zucker-Anteil in der Formel (III). Aber auch alle sekundären OH-Gruppen des Zuckers kommen als bevorzugte Ausführungsformen für die Veresterung in Betracht. Wenn  $n=2$  (und  $m=0$ ), ist es bevorzugt, wenn eine Veresterung an der primären OH-Gruppe und die zweite an einer der sekundären OH-Gruppen des Zuckers, insbesondere an einer der beiden sekundären OH-Gruppen am selben oder an einer der drei sekundären OH-Gruppen des zweiten Sechsringes, erfolgt.

Weitere bevorzugte Verbindungen der allgemeinen Formel (I) sind solche, bei denen  $X$ -O-Z Naringin ist,  $A_2$  die Acylreste folgender Säuren sind: p-Chlorphenylessig-, Hydrozimt-, Stearin-, 12-Hydroxystearin-, Palmitin-, Laurin-, Öl-, Coumar-, Caprin-, Zimt-, 4-Phenylbutter-, 4-Hydroxyphenylessig-, 5-Phenylvaleriansäure oder die unter den Handelsnamen erhältlichen Gemische Edenor UKD 6010 und UKD 7505;  $n = 1$  oder  $n=2$  und  $m$  gleichzeitig 1 ist. Wenn  $n$  und  $m$  beide 1 sind, ist die bevorzugte Position von  $A_2$  die primäre OH-Gruppe im Zucker, die von  $A_1$  entweder die 5-OH-Gruppe des Benzopyran- oder die 4'-Hydroxy-Gruppe des Phenylrings. Aber wie im Fall, wenn  $m=0$ , kann  $A_2$  auch über alle sekundären OH-Gruppen des Zuckers verestert werden. Wenn  $n = 2$  und  $m$  gleichzeitig 1 ist, ist es bevorzugt, wenn die eine Veresterung von  $A_2$  an der primären OH-Gruppe und die zweite an einer der sekundären OH-Gruppen des Zuckers, insbesondere an einer der beiden sekundären OH-Gruppen am selben oder an einer der drei sekundären OH-Gruppen des zweiten Sechsringes, und die Veresterung von  $A_1$  über den Benzopyran- oder den Phenylring erfolgt.

Die Erfinder haben herausgefunden, daß die Verbindungen der allgemeinen Formel (I) überraschenderweise durch milde lipasekatalysierte Veresterungen gewonnen werden können.

Demnach ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I). Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß ein Acetal (aus Zucker 5 und Flavon-/Isoflavon-Grundkörper) mit einer polyungesättigten Fettsäure (mit mindestens vier isolierten Doppelbindungen oder mit mindestens zwei konjugierten Doppelbindungen) wie einer konjugierten Linolsäure (Octadecadiensäure), mit einer arylaliphatischen Carbonsäure, mit einem Ester dieser Carbonsäuren oder mit einem 10 aktivierten Fettsäurederivat unter katalytischer Einwirkung von einem oder mehreren Enzymen verestert oder umgeestert wird. Die Veresterung an primären OH-Gruppen des Zuckers ist dabei bevorzugt, aber auch sekundäre Alkohol-Gruppen des Zuckers können verestert werden.

Zu den geeigneten enzymatischen Katalysatoren zur Veresterung der genannten 15 Säuren und den Hydroxylgruppen enthaltenden Acetal-Komponenten zählen die Hydrolasen, speziell die Lipasen (Ester-Hydrolasen) wie die Lipasen aus *Candida rugosa* (ehemals *Candida cylindracea*), *Candida antarctica*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus arrhizus* und *Mucor miehei*.

20 Eine bevorzugte Lipase ist die Lipase (Isoenzym B) aus *Candida antarctica*, wofür es zwei Gründe gibt. Erstens zeigt sie eine besonders hohe Selektivität bei der Veresterung der Acetale mit den ungesättigten Fettsäuren, obwohl diese nicht zu ihren typischen Substraten zählen. Des weiteren zeigt sie keine Grenzflächenaktivierung (ein entscheidendes Merkmal zur Klassifizierung von Hydrolasen in die Gruppe der 25 Lipasen), da ihr ein wichtiges Lipasestrukturmerkmal, eine bewegliche Peptidkette am aktiven Zentrum (sog. *lid*) fehlt.

Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen nach den üblichen Methoden der chemischen Synthese kommt es wegen der Anwesenheit mehrerer freier 30 Hydroxylgruppen des Zuckers und/oder Flavon-/Isoflavon-Grundkörpers in der Regel zur Bildung von Gemischen aus einfach und mehrfach veresterten Produkten, so daß die Einführung und Entfernung von Schutzgruppen notwendig ist, wenn man gezielt eine bestimmte Verbindung synthetisieren will.

Gerade die gezielte Veresterung ist aber für die biologische Verfügbarkeit und Verträglichkeit der erfindungsgemäßen Substanzen entscheidend. Die chemische Synthese führt jedoch aufgrund mangelnder Regioselektivität zu groben 5 Produktgemischen. Daher ist die hier beschriebene enzymatische (siehe Beispiele) milde und regioselektive Synthese von Vorteil. Erfindungsgemäß bedeutet regiospezifisch, daß nur eine bestimmte OH-Gruppe eines Polyols verestert wird. Entsprechend bedeutet regioselektiv, daß eine bestimmte OH-Gruppe eines Polyols bevorzugt, aber nicht ausschließlich, verestert wird.

10

Sind die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) erst einmal mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens hergestellt worden, muß in aller Regel ein Verfahren folgen, um die gewünschte(n) Verbindung(en) aufzureinigen. Somit besteht ein weiterer 15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung darin, ein Verfahren zur Aufreinigung der Verbindungen der Formel (I) bereitzustellen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es sich um ein wäßriges Zweiphasen-Extraktionsverfahren mit organischen Lösungsmitteln handelt, mit dem die Zielverbindung selektiv von den nicht umgesetzten Fettsäuren getrennt werden kann. Vorzugsweise handelt es sich bei dem organischen Lösungsmittel um n-Hexan, Cyclohexan, THF, Dieethylether. Alternativ kann die 20 Aufreinigung auch durch ein chromatographisches Verfahren an Kieselgel, vorzugsweise mit Ethylacetat/Methanol- oder Dichlormethan/Methanol-Gemischen mit geringen Anteilen Essigsäure und/oder Wasser erfolgen, das auch zusätzlich zu einem wäßrigen Zweiphasen-Extraktionsverfahren mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden kann.

25

Da die erfindungsgemäßen Flavon-/Isoflavonglykoside der Formel (I) eine gute biologische Verfügbarkeit und Wirkung haben, lassen sie sich in kosmetischen und pharmazeutischen Zubereitungen und/oder als Nahrungsmittel-Zusatzstoffe verwenden mit dem Ergebnis, daß die Qualität ebendieser Produkte deutlich verbessert wird.

30

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel(I) weisen eine Inhibition von Hautproteasen (anti-aging, anti-wrinkling), ein antioxidatives Potential, hautaufhellende Wirkung sowie eine Inhibition der Transkription auf. Überraschend ist vor allem die

hautaufhellende Wirkung (infolge einer Hemmung der Tyrosinase) dieser Verbindungen, insbesondere die gute hautaufhellende Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen, bei denen Z-O-X Naringin bedeutet und deren primäre OH-Gruppe entweder mit Phenylpropionsäure, mit Hydroxyphenylessigsäure oder mit p-5 Chlorphenylessigsäure verestert ist.

Weiterhin wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel(I), insbesondere diejenigen Verbindungen, bei denen Z-O-X Naringin bedeutet und deren primäre OH-Gruppe entweder mit Phenylpropionsäure, mit Hydroxyphenylessigsäure 10 oder mit p-Chlorphenylessigsäure verestert ist, in der Lage sind, die sonnenlichtinduzierte Expression von MMP-1, TIMP und Cola<sub>1</sub> in kosmetisch erwünschter Weise zu beeinflussen und somit dem Verlust an Kollagen in der Dermis entgegenzuwirken. Dadurch eignen sich diese Verbindungen hervorragend für eine kosmetische Behandlung der Haut, durch welche einer sonnenlichtinduzierten Alterung 15 der Haut vorgebeugt wird und/oder durch welche deren Folgen vermindert werden.

Die Bildung des Kollagens wird insbesondere durch das Ausmaß der Expression von MMP und TIMP beeinflusst. Zur Analyse der Faktoren, die am Prozeß der Homöostase sonnenlichtbestrahlter Hautzellen beteiligt sind, sind folgende Strategien möglich:

- 20 a) MMP:
  - Quantifizierung der Enzymaktivität von MMP-1
  - Quantifizierung des synthetisierten MMP-1-Proteins.
  - Quantifizierung der synthetisierten MMP-1-mRNA..
- b) TIMP
  - Quantifizierung des synthetisierten TIMP-Proteins.
  - Quantifizierung der synthetisierten TIMP-mRNA..
- 25 c) Kollagen
  - Quantifizierung des synthetisierten Kollagen-Proteins.
  - Quantifizierung der synthetisierten Cola<sub>1</sub>-mRNA..

Die Produktion der mRNA ist im Verlauf der Proteinsynthese der erste und damit wichtigste Schritt. Wirkstoffe, die einen Effekt auf die mRNA-Produktion zeigen, haben 30 somit automatisch auch einen Effekt auf die Proteinmenge und die Enzymaktivität. In einem anschließenden Schritt können die Auswirkungen der Effekte auf die mRNA-Produktion durch den Nachweis des Proteins Kollagen im Hautmodell selbst nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Erfindung konnte gezeigt werden, daß erfindungsgemäß Naringin-Derivate in der Lage sind, die Expression vom MMP zu reduzieren, die Expression von TIMP zu erhöhen, die Expression von Cola<sub>1</sub> zu erhöhen sowie die Bildung von Kollagen zu erhöhen.

In der fotogalterten Haut wird MMP-1 zwar zum überwiegenden Teil von Fibroblasten produziert, die Reaktionen der Haut auf Stress dürfen aber nicht als Reaktionen einzelner, isolierter Hautzellen betrachtet werden. Vielmehr ist jede Zelle in ein komplexes Kommunikationsnetzwerk eingebunden. Dieses Netzwerk bewirkt den Informationsaustausch direkt benachbarter Zellen, aber auch zwischen weiter voneinander entfernt lokalisierten Zellen, wie z.B. den Zellen der Epidermis und der Dermis. An den Kommunikationsmechanismen zwischen den Zellen der Haut sind Signalmoleküle wie z.B. Interleukine, Wachstumsfaktoren (z.B. KGF, EGF oder FGF) usw. beteiligt. Aus diesem Grund wurde die Analyse der Wirkstoffeffekte an Hautmodellen durchgeführt, die aus einem dermalen und einem epidermalen Kompartiment bestehen.

Weiterhin wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen im Vergleich zu herkömmlichen Wirkstoffen gegen eine Lichtalterung der Haut erheblich weniger phototoxisch sind.

Darüber hinaus sind die erfindungsgemäßen Verbindungen besonders gut in lipophile Basisrezepturen einarbeitbar und lassen sich auf einfache Weise als stabile Emulsionen formulieren.

Dementsprechend werden die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) zur Herstellung von kosmetischen und/oder pharmazeutischen Zubereitungen und/oder Nahrungs- bzw. Futtermitteln verwendet. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in Form der Reinsubstanz oder als Gemisch aus Pflanzenextrakten unterschiedlicher Herkunft vorliegen bzw. verwendet werden.

Bevorzugterweise werden dabei die (Iso-)Flavone und deren Glykoside als Bestandteile eines aus einer Pflanze gewonnenen Substanzgemisches, insbesondere eines pflanzlichen Extraktes, in den Zubereitungen/Zusatzstoffen verwendet. Solche pflanzlichen Substanzgemische können in einer dem Fachmann geläufigen Weise, 5 beispielsweise durch Auspressen oder Extrahieren aus Pflanzen wie Zitrusgewächsen (Familie der Rutaceae) oder Akazien gewonnen werden.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind danach die Verwendung der Verbindungen der Formel (I) zur Herstellung von kosmetischen und/oder pharmazeutischen 10 Zubereitungen; die Verwendung als Nahrungsergänzungs- oder -zusatzstoffe in Nahrungszubereitungen und in Futtermitteln (z.B. für die Tierzucht); kosmetische und pharmazeutische Zubereitungen sowie Nahrungsmittel-/zubereitungen und Futtermittel, die (eine) Verbindung(en) der Formel (I) enthalten.

15 Die unter erfindungsgemäßer Verwendung der Verbindungen (I) erhältlichen kosmetischen Zubereitungen, wie Haarshampoos, Haarlotionen, Schaumbäder, Duschbäder, Cremes, Gele, Lotionen, alkoholische und wäßrig/alkoholische Lösungen, Emulsionen, Wachs/Fett-Massen, Stiftpräparate, Puder oder Salben, können ferner als Hilfs- und Zusatzstoffe milde Tenside, Ölkörper, Emulgatoren, Überfettungsmittel, 20 Perlglanzwachse, Konsistenzgeber, Verdickungsmittel, Polymere, Siliconverbindungen, Fette, Wachse, Stabilisatoren, biogene Wirkstoffe, Deowirkstoffe, Antischuppenmittel, Filmbildner, Quellmittel, UV-Lichtschutzfaktoren, Antioxidantien, Hydrotrope, Konservierungsmittel, Insekten repellentien, Selbstbräuner, Solubilisatoren, Parfümöl, Farbstoffe, keimhemmende Mittel und dergleichen enthalten.

25 Die Einsatzmenge der erfindungsgemäßen Verbindungen in den kosmetischen (aber auch pharmazeutischen) Zubereitungen liegt üblicherweise im Bereich von 0,01 bis 5 Gew.-%, vorzugsweise jedoch im Bereich von 0,1 bis 1 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmasse der Zubereitungen.

30 Zur Herstellung pharmazeutischer oder auch kosmetischer Zubereitungen lassen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel (I), gegebenenfalls in Kombination mit anderen Wirksubstanzen, zusammen mit einem oder mehreren inerten

üblichen Trägerstoffen und/oder Verdünnungsmitteln, z. B. mit Maisstärke, Milchzucker, Rohrzucker, mikrokristalliner Cellulose, Magnesiumstearat, Polyvinylpyrrolidon, Zitronensäure, Weinsäure, Wasser, Wasser/Ethanol, Wasser/Glycerin, Wasser/Sorbit, Wasser/Polyethylenglykol, Propylenglykol, Carboxymethylcellulose oder fetthaltigen

- 5 Substanzen wie Hartfett oder deren geeigneten Gemischen, in übliche galenische Zubereitungen wie Tabletten, Dragees, Kapseln, Pulver, Suspensionen, Tropfen, Ampullen, Säfte oder Zäpfchen einarbeiten.

Die zur Erzielung einer entsprechenden Wirkung bei pharmazeutischen Anwendungen

- 10 erforderliche tägliche Dosierung beträgt zweckmäßigerweise 0,1 bis 10 mg/kg Körpergewicht, vorzugsweise 0,5 bis 2 mg/kg Körpergewicht.

Die unter erfindungsgemäßer Verwendung der Verbindungen der Formel (I) erhältlichen Nahrungsersatz- und -zusatzstoffe wie Sportler-Drinks enthalten geeigneterweise die

- 15 Verbindung(en) der Formel (I) in einer Menge, die bei einem üblichen Bedarf an Flüssigkeitsaufnahme von 1 bis 5 Litern pro Tag zu einer Dosierung dieser Verbindungen von an 0,1 bis 10 mg, vorzugsweise 0,5 bis 5 mg, pro kg Körpergewicht führt. Eine beispielhafte Verwendung in der Nahrungsmittelindustrie besteht für die Verbindungen der Formel (I) als Färbe- und/oder Gewürzstoffe.

**Beispiele****Beispiel 1: Herstellung von 6-O-cis-9,trans-11-Octadecadienoyl-Naringin**

5 2 g D-(-)-Naringin 5 g, CLA (Edenor UKD 6010), 12 g Molekularsieb, 15 ml t-Butanol und 10 g immobilisierte Lipase B aus *Candida antarctica* wurden 40 Stunden bei 60°C und 100 rpm am Magnetrührer im 250 ml Erlenmeyerkolben inkubiert. Die Umsetzung wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel KG60-Platten mit Fluoreszenzindikator; Laufmittel: Ethylacetat/Methanol 10:1 v/v; Visualisierung: UV-10 Detektion sowie mittels Essigsäure/Schwefelsäure/Anisaldehyd (100:2:1 v/v/v) Tauchreagenz nachgewiesen. Das Produkt wurde mit 20 ml n-Hexan extrahiert und über Säulenchromatographie (Kieselgel F60; Laufmittel: Ethylacetat/Methanol 10/1 v/v) gereinigt.

R<sub>f</sub>-Wert: 0.47 (Ethylacetat/Methanol 10:1)

15

**Beispiel 2: Herstellung von 6-O-Naringin-(3-phenyl-propionsäure)ester**

5,8 g Naringin, 1,5 g 3-Phenylpropionsäure, 3,7 g Molekularsieb, 15 ml t-Butanol und 11 g immobilisierte Lipase B aus *Candida antartica* wurden 24 Stunden bei 60°C und 100 20 rpm in einem 250 ml Kolben inkubiert. Die Umsetzung wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>; Laufmittel Ethylacetat/Methanol 10:1 v/v; Visualisierung durch UV-Detektion) verfolgt. Bei Abbruch der Reaktion betrug der Umsatz bezogen auf Naringin 20%. Das Produkt wurde mit 20 ml n-Hexan extrahiert und über Säulenchromatographie (Kieselgel F60; Laufmittel: Ethylacetat/Methanol 10/1 25 v/v) gereinigt.

R<sub>f</sub>-Wert: 0,16 (Ethylacetat/Methanol 10:1 v/v)

Ausbeute: 0,85 g

Die säulenchromatographische Trennung wurde nicht optimiert. Neben Fraktionen mit dem reinen Produkt wurden weiterhin Mischfraktionen erhalten, die unumgesetztes 30 Naringin enthielten. Zur Bestimmung der angegebenen Ausbeute wurden lediglich diejenigen Fraktionen aus der Säulenchromatographie verwendet, welche ausschließlich das gewünschte Produkt enthielten.

**Beispiel 3: Herstellung von 6-O-Naringin-(p-Cl-phenylessigsäure)ester**

5,8 g Naringin, 1,7 g p-Chlorphenylessigsäure, 3,8 g Molekularsieb, 15 ml t-Butanol und 5 11 g immobilisierte Lipase B aus *Candida antartica* wurden 24 Stunden bei 60°C und 100 rpm in einem 250 ml Kolben inkubiert. Die Umsetzung wurde mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>; Laufmittel Ethylacetat/Methanol 10:1 v/v; Visualisierung durch UV-Detektion) verfolgt. Bei Abbruch der Reaktion betrug der 10 Umsatz bezogen auf Naringin 20%. Das Produkt wurde mit 20 ml n-Hexan extrahiert und über Säulenchromatographie (Kieselgel F60; Laufmittel: Ethylacetat/Methanol 10/1 v/v) gereinigt.

R<sub>r</sub>-Wert: 0,20 (Ethylacetat/Methanol 10:1 v/v)

Ausbeute: 0,50 g

Die säulenchromatographische Trennung wurde nicht optimiert. Neben Fraktionen mit 15 dem reinen Produkt wurden weiterhin Mischfraktionen erhalten, die unumgesetztes Naringin enthielten. Zur Bestimmung der angegebenen Ausbeute wurden lediglich diejenigen Fraktionen aus der Säulenchromatographie verwendet, welche ausschließlich das gewünschte Produkt enthielten.

20 **Beispiel 4: Herstellung weiterer Naringin-Derivate**

Naringin-Derivate, hergestellt wie unter Beispiel 1 beschrieben (Umsetzung mit Novozym SP435 für 48 h bei 65°C, Rührgeschwindigkeit 1200 Upm). Mittels Dünnschichtchromatographie wurde die Umsetzung kontrolliert sowie der Umsatz 25 (bezogen auf das eingesetzte Naringin) bestimmt.

<b>Umsatz</b>		
4.1	Stearinsäure	+
4.2	Palmitinsäure	++

		Umsatz
4.3	Laurinsäure	++
4.4	Ölsäure	+
4.5	Coumarsäure	+
4.6	Caprinsäure	+
4.7	Zimtsäure	+
4.8	4- Hydroxyphenylessigsäure	++
4.9	5-Phenylvaleriansäure	++
4.10	4-Phenylbuttersäure	++
4.11	12-Hydroxy-Stearinsäure	+
4.12	Edenor UKD6010	+

5

+ bedeutet bis 15 % Umsatz

++ bedeutet über 15 % Umsatz

10

Beispiel 5: Hemmung der Tyrosinaseaktivität

Tyrosinasen katalysieren physiologisch einen wichtigen Schritt in der Melanin-Synthese (L-Dopa zu L-Dopaquinone, das weiter cyclisiert und erneut durch eine Tyrosinase zu 15 Dopachrom umgesetzt wird). Eine Hemmung der Tyrosinase kann damit zu einer hautaufhellenden Wirkung führen.

Die Aktivität von Pilz-Tyrosinase (Sigma) wurde in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der erfindungsgemäßen Wirkstoffe anhand der enzymatischen Umsetzung von LDOPA zu Dopachrom bestimmt. Das Absorptionsmaximum des 20 Dopachroms (rotbraun) liegt bei  $\lambda=475\text{nm}$ . Der lineare Anstieg der Absorption (A) des

Dopachroms pro Zeiteinheit (t) ist ein Maß für die Aktivität der Tyrosinase ( $\Delta A/\Delta t$ ). Die Aktivität der Tyrosinase in Abwesenheit der Wirkstoffe ( $\Delta A_1/\Delta t_1$ ) diente als Referenz und wurde auf 100% gesetzt. Unter analogen Bedingungen wurde die Tyrosinase-Restaktivität in Gegenwart der Wirkstoffe ( $\Delta A_2/\Delta t_2$ ) bestimmt. Jede Messung wurde 5 zweifach in parallelen Ansätzen durchgeführt. Die Schwankung der Ergebnisse der Methode liegt bei ca.  $\pm 10\%$ .

Verwendete Chemikalien:

15 L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) (Sigma)  
.0  $KH_2PO_4$  (J.T. Baker)  
Tyrosinase, 50.000 units (Sigma)  
KOH

Benötigte Lösungen:

15 50 mM  $KH_2PO_4$  - Puffer in  $H_2O$  bidest. (Einstellung auf pH = 6.5 mit 1 M wäßriger KOH)  
2.5 mM L-DOPA in  $H_2O$  bidest.  
340 U/ml Tyrosinase Stammlösung in kaltem  $KH_2PO_4$ - Puffer, pH = 6.5  
Stammlösungen des zu prüfenden Wirkstoffs in bidest. Wasser bzw. Ethanol, worin die Konzentration des Wirkstoffs 10-fach höher war als in der Zeile „Wirkstoffkonzentration .0 im Testsystem“ unter „Ergebnisse“ angegeben

Reaktionscocktail:

10 ml  $KH_2PO_4$ - Puffer  
10 ml L-DOPA  
25 9 ml  $H_2O$  bidest.

Der Reaktionscocktail wurde ebenso wie die Tyrosinase-Stammlösung erst vor Versuchsbeginn hergestellt. Die Tyrosinase-Stammlösung muß unbedingt kühl gelagert werden. Die L-DOPA-Lösungen sollten dunkel und in gut verschlossenen Gefäßen unter Sauerstoffausschluß aufbewahrt werden. Bei evtl. Grauverfärbung (Oxidation 30 durch Luftsauerstoff) muß die Lösung frisch angesetzt werden.

Testsystem (Probenvolumen 1 ml) und Reaktionsdurchführung:

33 µl Tyrosinase-Stammlösung

100 µl Wirkstoff-Stammlösung

5 Ad 1000 µl Reaktionscocktail

Die Aktivität der Tyrosinase in Abwesenheit der Wirkstoffe diente als Referenz und wurde auf 100% gesetzt. Sämtliche Proben wurden vor Meßbeginn am Vibrofix gut durchmischt. Der pH-Wert wurde kontrolliert und ggf. auf pH= 6.5 eingestellt. Die Messung erfolgte mit einem Uvikon-860-Photometer der Fa. Kontron. Die Absorption des Dopachroms wurde am Absorptionsmaximum bei  $\lambda=475\text{nm}$  über einen Zeitraum

10 von 5 min. bei 25°C detektiert, wobei das Meßintervall 20-30 s betrug.

Ergebnisse:

Wirkstoff: 6-O-Naringin-(3-phenyl-propionsäure)ester aus Beispiel 2

15 Wirkstoffkonzentration im Testsystem 0.005% 0.05% 0.5% (w/v in H<sub>2</sub>O bidest.)  
Restaktivität der Tyrosinase in % 98.9 69.1 0.7  
(IC<sub>50</sub>= 0.18%)

Wirkstoff: 6-O-Naringin-(p-Cl-phenylessigsäure)ester aus Beispiel 3

20 Wirkstoffkonzentration im Testsystem 0.01% 0.1% (w/v in 98% Ethanol)  
Restaktivität der Tyrosinase in % 45.1 15.4

Beispiel 6: Phototoxizität

25 Dermale Fibroblasten menschlicher Haut wurden mit steigenden Konzentrationen von Retinol (Tabelle 1), 6-O-Naringin-(p-Cl-phenylessigsäure)ester (Tabelle 2) und 6-O-Naringin-(3-phenylpropionsäure)ester (Tabelle 3) kultiviert. Mit Hilfe eines MTT-Tests wurde die Phototoxizität der Substanzen gemessen. Für die Ermittlung der Phototoxizität wurden die behandelten Zellen mit simuliertem Sonnenlicht, entsprechend einer Dosis von 10 J UV-A/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die Vitalität nicht behandelter Zellen wurde gleich 100 % gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen.

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit einem Sonnenlichtsimulator, aus dessen Emissionsspektrum der UV-A Anteil der Strahlung zur Quantifizierung gemessen wurde. Vorteil dieses experimentellen Designs ist die Tatsache, daß mit dem kompletten Spektrum des Sonnenlichts gearbeitet wird und somit die Alltagssituation hervorragend nachgestellt wird. Demgegenüber arbeiten viele andere Forschungslaboratorien mit reinen UV-A und/oder UV-B Strahlern.

10 Tabelle 1: Phototoxizität von Retinol

	Konzentration Retinol (ppm)	Vitalität (%; in Klammern: SEM)
15	0,0028	99 (7,4)
	0,014	95 (19,8)
	0,028	80 (25,9)
	0,14	28 (11,8)
	0,28	4 (2,1)

20 Tabelle 2: Phototoxizität von 6-O-Naringin-(p-Cl-phenylessigsäure)ester

	Konzentration des Naringinderivats (ppm)	Vitalität (%; in Klammern: SEM)
25	5	115 (15)
	10	96 (17,2)
	50	81 (8,3)
	100	3 (1,7)
30	500	3 (1,8)

Tabelle 3: Phototoxizität von 6-O-Naringin-(3-phenyl-propionsäure)ester

	Konzentration des Naringinderivats (ppm)	Vitalität (%; in Klammern: SEM)
35	5	125 (5,8)
	10	103 (19,8)
40	50	98 (15,1)
	100	101 (8,3)
	500	29 (4,5)
	1000	2 (0,5)

Die Resultate zeigen, daß 6-O-Naringin-(3-phenyl-propionsäure)ester und 6-O-Naringin-(p-Cl-phenylessigsäure)ester verglichen mit Retinol erst in höheren Konzentrationen toxische Effekte aufweisen. Retinol ist bereits in sehr niedrigen Konzentrationen toxisch. Die Verringerung der Vitalität um mehrere Zehnerpotenzen 5 belegt die starke Phototoxizität von Retinol.

Beispiel 7: Wirkungen auf die lichtinduzierte Expression von MMP-1-, TIMP- und Cola<sub>1</sub>-mRNA

10 Die Wirkungen von 6-O-Naringin-(3-phenyl-propionsäure)ester (Tabelle 4) bzw. 6-O-Naringin-(p-Cl-phenylessigsäure)ester (Tabelle 5) auf die lichtinduzierte Expression von MMP-1, TIMP und Cola<sub>1</sub> wurden bei subphototoxischen Konzentrationen gemessen. Hierzu wurde die mRNA-Menge für MMP1, TIMP und Cola<sub>1</sub> quantifiziert. Hautmodelle 15 wurden für 12 Stunden mit den Testsubstanzen behandelt und dann mit simuliertem Sonnenlicht, entsprechend einer Dosis von 10 J UV-A/cm<sup>2</sup>, bestrahlt. Nach weiteren 48 Stunden in Gegenwart der Wirkstoffe wurde die RNA der Zellen präpariert und durch Northern-Blots mit spezifischen Gensonden analysiert. Zur Kontrolle der in den Experimenten eingesetzten RNA-Menge wurden Northern-Blots mit einer 18S- 20 spezifischen Gensonde durchgeführt. Zur Quantifizierung der Signalintensitäten wurden die Autoradiogramme densitometrisch vermessen und die Werte der Signale für MMP1, TIMP und Cola<sub>1</sub> auf die dazugehörigen Werte der 18S Signale bezogen. Die Zahlenwerte in den Tabellen stellen die densitometrische Quantifizierung der Signale eines Northern-Blots nach deren Normalisierung dar. Die lichtinduzierte Expression von 25 MMP1, TIMP und Cola<sub>1</sub> bei nicht behandelten Zellen wurde jeweils auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen.

30 Tabelle 4: Effekte von 6-O-Naringin-(p-Cl-phenylessigsäure)ester auf die Expression von MMP1, TIMP und Collagen

Konzentration des Naringinderivats ( ppm)	MMP1	TIMP	Collagen
35 0, unbestrahlt	100	100	100
0, bestrahlt	135	89	66
5, bestrahlt	129	62	56
50, bestrahlt	40	77	79

**Tabelle 5: Effekte von 6-O-Naringin-(3-phenyl-propionsäure)ester auf die Expression von MMP1, TIMP und Collagen**

5

	Konzentration des Naringinderivats ( ppm)	MMP1	TIMP	Collagen
	0, unbestrahlt	100	100	100
10	0, bestrahlt	135	89	66
	10, bestrahlt	167	104	74
	100, bestrahlt	87	134	99

15 Die Bestrahlung von Hautmodellen mit simuliertem Sonnenlicht führte zu einer starken Induktion der MMP1-mRNA-Synthese, während die Synthese von Kollagen herunterreguliert wurde. Die Produktion von TIMP blieb weitgehend unbeeinflußt. Tabelle 4 zeigt, daß 50 ppm 6-O-Naringin-(p-Cl-phenylessigsäure)ester die sonnenlichtinduzierte Expression von MMP-1 sehr effektiv reduzierten. Die Expression 20 von TIMP wurde nur geringfügig beeinflußt, die Expression von Cola<sub>1</sub> ist gegenüber der bestrahlten, unbehandelten Probe deutlich gesteigert. Die Behandlung der Zellen mit 100 ppm 6-O-Naringin-(3-phenyl-propionsäure)ester reduzierte die sonnenlichtinduzierte Expression von MMP-1 auf das Niveau der unbestrahlten 25 unbehandelten Probe (Tabelle 5). Demgegenüber stieg die Expression von TIMP um ca. 35% an. Die Expression von Cola<sub>1</sub> konnte auf das Niveau der unbestrahlten, unbehandelten Kultur gesteigert werden.

Die prozentuale Veränderung der Expression von MMP, TIMP und Cola<sub>1</sub> in Kulturen bestrahlter Fibroblasten nach Behandlung mit 50 bzw. 100 ppm der geprüften 30 Naringinderivate im Vergleich zu bestrahlten, unbehandelten Kulturen ist in Tabelle 6 zusammengefaßt.

**Tabelle 6:**

35	Expression von	6-O-Naringin-(p-Cl-phenylessigsäure)ester (50 ppm)	6-O-Naringin-(3-phenyl-propionsäure)ester (100 ppm)
	MMP	-70%	-37%
40	TIMP	-15%	50%
	Cola <sub>1</sub>	27%	64%

Die jeweils in Tabelle 6 angegebene Konzentration führte für beide Naringinderivate zu einer deutlichen Hemmung der MMP-Expression und einer gesteigerten Cola<sub>1</sub>-Produktion. Die 6-O-Naringin-(3-phenyl-propionsäure)ester steigerte die TIMP-Produktion erheblich, während 6-O-Naringin-(p-Cl-phenylessigsäure)ester nur einen geringen Einfluß nahm.

Beispiel 8: Wirkung auf die Kollagenproduktion

10 Zum Nachweis der erhöhten Produktion von Kollagen auf Proteinebene wurden Fibroblasten in einem dreidimensionalen Kultursystem für 5 Tage mit den Prüfsubstanzen behandelt. Am sechsten Tag wurde die Menge des gebildeten Kollagens im Vergleich zu Nichtkollagenprotein über den Einbau tritierten Proteins bestimmt. Tabelle 7 zeigt die prozentuale Steigerung des Kollagenanteils am 15 Gesamtprotein, bestimmt aus behandelten Fibroblastenkulturen gegenüber unbehandelten Kulturen.

20

Tabelle 7:

		6-O-Naringin-(3-phenyl- (propionsäure)ester			6-O-Naringin- (p-Cl-phenylessigsäure)ester	
25	Konzentration	1ppm	10ppm	100ppm	5ppm	50ppm
30	Steigerung der Kollagenproduktion	8%	8%	19%	-3%	41%

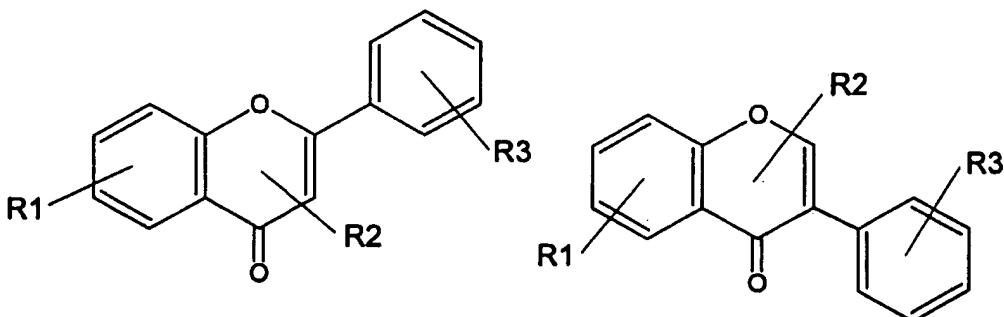
## Patentansprüche

## 5 1. Flavon- und Isoflavonglykosid-Derivate der allgemeinen Formel (I):

$[A_1-C(=O)O]_m-[X-O-Z]-[O-C(=O)-A_2]_n$  (I),

worin  $[X-O-Z]$  eine Flavon- oder Isoflavonglykosid-Struktur darstellt,

worin X einen Flavon- oder Isoflavongrundkörper der Formel (IIa) bzw. (IIb)



10

(IIa)

(IIb)

darstellt, wobei der (Iso-)Flavongrundkörper einfach oder mehrfach substituiert und/oder einfach oder mehrfach reduziert (hydriert) ist,

worin Z (Zucker) für ein Mono-, Disaccharid oder Polysaccharid steht, das acetalisch

15

an den Rest X gebunden und n-fach esterartig mit  $A_2$  substituiert ist,

worin  $[A_1-C(=O)]$  einen Acylrest am Flavon- oder Isoflavongrundkörper darstellt,

worin  $A_1$  und  $A_2$  unabhängig voneinander einen mehrfach ungesättigten  $C_{15} - C_{25}$ -Alkenylrest mit mindestens 4 isolierten und/oder mindestens zwei konjugierten Doppelbindungen oder einen arylaliphatischen Rest mit 1-4 Methylengruppen zwischen Ester-Gruppe und aromatischem Ring darstellen,

worin  $[C(=O)A_2]$  einen Acylrest am Zucker Z darstellt,

worin n eine ganze Zahl (1, 2, 3, ...), nicht aber 0 ist,

worin m eine ganze Zahl einschließlich 0 (0, 1, 2, 3, ...) ist, und

worin R1, R2, R3 Hydroxylgruppen oder Wasserstoff-Atome darstellen.

25

2. Die Derivate von Anspruch 1, wobei Z ein Monosaccharid, insbesondere Rhamnose, Threose, Erythrose, Arabinose, Lyxose, Ribose, Xylose, Allose, Altrose, Galactose, Glucose, Gulose, Idose, Mannose, Talose und Fructose, oder ein Disaccharid, insbesondere ein Disaccharid, das aus den zuvor genannten Monosacchariden 5 aufgebaut ist, in ihren jeweils natürlich vorkommenden stereoisomeren Formen, ist.

3. Die Derivate von Anspruch 1 oder 2, wobei der (Iso-)Flavonglykosid-Grundkörper X-O-Z in der allgemeinen Formel (I) Asparatin, Orientin (Lutexin), Cisorientin (Lutonaretin), Isoquercitin, Naringin, oder Rutin ist.

10 4. Die Derivate von einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der (Iso-)Flavonglykosid-Grundkörper X-O-Z Naringin der Formel (III)

15 ist.

5. Die Derivate von einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei X-O-Z Naringin gemäß Formel (III) ist; wobei  $A_2$  der Acylrest einer der folgenden Säuren ist: p-Chlorphenylessig-, Hydrozimt-, Stearin-, 12-Hydroxystearin-, Palmitin-, Laurin-, Öl-, 20 Coumar-, Caprin-, Zimt-, 4-Phenylbutter-, 4-Hydroxyphenylessig-, 5-Phenylvaleriansäure oder eines der unter den Handelsnamen erhältlichen Gemische Edenor UKD 6010 und UKD 7505; und wobei n 1 oder 2 und m gleichzeitig 0 ist.

25 6. Die Derivate von Anspruch 5, wobei n 1, m 0 ist und  $A_2$  an die primäre OH-Gruppe des Zuckers in Formel (III) gebunden ist.

7. Die Derivate von einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei X-O-Z Naringin gemäß Formel (III) ist; wobei A<sub>2</sub> der Acylrest einer der folgenden Säuren ist: p-Chlorphenylessig-, Hydrozimt-, Stearin-, 12-Hydroxystearin-, Palmitin-, Laurin-, Öl-, Coumar-, Caprin-, Zimt-, 4-Phenylbutter-, 4-Hydroxyphenylessig-, 5-Phenylvaleriansäure oder eines der unter den Handelsnamen erhältlichen Gemische Edenor UKD 6010 und UKD 7505; und wobei n 1 oder 2 und m gleichzeitig 1 ist.

8. Die Derivate von Anspruch 7, wobei n und m 1 sind, A<sub>2</sub> an die primäre OH-Gruppe des Zuckers in Formel (III) und A<sub>1</sub> entweder an die 5-OH-Gruppe des Benzopyran- oder an die 4'-Hydroxy-Gruppe des Phenylrings gebunden sind.

9. Die Derivate von Anspruch 8, wobei n 2 und m 1 sind, ein A<sub>2</sub> an die primäre OH-Gruppe und das zweite A<sub>2</sub> an eine der sekundären OH-Gruppen, insbesondere an eine der beiden sekundären OH-Gruppen am selben oder an eine der drei sekundären OH-Gruppen des zweiten Sechsringes, des Zuckers in Formel (III) und A<sub>1</sub> entweder an die 5-OH-Gruppe des Benzopyran- oder an die 4-Hydroxy-Gruppe des Phenylrings gebunden sind.

10. Verfahren zur Herstellung der Derivate der Formel (I) von einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Acetal X-O-Z aus Zucker und (Iso-)Flavon-Grundkörper, wobei diese (Iso-)Flavon-Grundkörper in Form der Reinsubstanz oder als Gemisch aus Pflanzenextrakten unterschiedlicher Herkunft vorliegen, mit einer polyungesättigten Fettsäure mit mindestens vier isolierten Doppelbindungen und/oder mit mindestens zwei konjugierten Doppelbindungen, mit einer arylaliphatischen Carbonsäure, mit einem Ester dieser Carbonsäuren oder mit einem aktivierten Fettsäurederivat unter katalytischer Einwirkung von einem oder mehreren Enzymen verestert oder umgeestert wird.

11. Das Verfahren von Anspruch 10, wobei die polyungesättigten Fettsäure eine konjugierte Linolsäure (Octadecadiensäure) ist.

12. Das Verfahren von Anspruch 10 oder 11, wobei das oder die Enzyme eine oder mehrere Hydrolasen ist bzw. sind.

13. Das Verfahren von Anspruch 12, wobei die Hydrolase(n) die Lipasen aus *Candida rugosa* (ehemals *Candida cylindracea*), *Candida antarctica*, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizopus arrhizus* und *Mucor miehei*,  
5 insbesondere die Lipase (Isoenzym B) aus *Candida antarctica*, ist (sind).

14. Das Verfahren von einem der Ansprüche 10 bis 13, wobei sich an die Veresterungsreaktion ein Schritt zur Aufreinigung der Verbindungen der Formel (I) anschließt, der entweder ein wäßriges Zweiphasen-Extraktionsverfahren mit organischen Lösungsmitteln wie n-Hexan, Cyclohexan, THF oder Dieethylether oder ein chromatographisches Verfahren an Kieselgel, vorzugsweise mit geringen Anteilen Essigsäure und/oder Wasser, ist.  
10

15. 15. Kosmetische oder pharmazeutische Zusammensetzung oder Nahrungs- bzw. Futtermittel-Zusammensetzung, enthaltend mindestens eines der Derivate von einem der Ansprüche 1 bis 9.

16. Verwendung eines Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur kosmetischen Behandlung der sonnenlichtinduzierten Alterung der menschlichen Haut.  
20

17. Verwendung eines Derivats nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur kosmetischen Hautaufhellung.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 01/04151

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 7 C07H17/07 A61K7/42 A61K31/7048 A23L3/3544 C12P7/62  
 C12P19/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 7 C07H A61K A23L C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAKAJIMA NOBUYOSHI ET AL: "LIPASE-CATALYZED DIRECT AND REGIOSELECTIVE ACYLATION OF FLAVONOID GLUCOSIDE FOR MECHANISTIC INVESTIGATION OF STABLE PLANT PIGMENTS" JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 87, no. 1, 1999, pages 105-107, XP001015236 ISSN: 1389-1723 the whole document	1-17
X	DE 199 22 287 A (COLETICA LYON) 25 November 1999 (1999-11-25) Beschreibung Beispiele 22-26	1-4, 15-17

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

17 August 2001

24/08/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

de Nooy, A

2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. International Application No  
PCT/EP 01/04151

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DANIELI ET AL: "Enzyme-mediated regioselective acylations of flavonoid disaccharide monoglycosides"          HELVETICA CHIMICA ACTA, CH, VERLAG HELVETICA          CHIMICA ACTA. BASEL,          vol. 73, no. 7, 1990, pages 1837-1844,          XP002090940          ISSN: 0018-019X          the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,10,15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No  
PCT/EP 01/04151

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19922287 A	25-11-1999	FR 2778663 A JP 2000026263 A US 6235294 B	19-11-1999 25-01-2000 22-05-2001

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In: Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 01/04151

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C07H17/07 A61K7/42 A61K31/7048 A23L3/3544 C12P7/62  
C12P19/44

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C07H A61K A23L C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NAKAJIMA NOBUYOSHI ET AL: "LIPASE-CATALYZED DIRECT AND REGIOSELECTIVE ACYLATION OF FLAVONOID GLUCOSIDE FOR MECHANISTIC INVESTIGATION OF STABLE PLANT PIGMENTS" JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 87, Nr. 1, 1999, Seiten 105-107, XP001015236 ISSN: 1389-1723 das ganze Dokument —	1-17
X	DE 199 22 287 A (COLETICA LYON) 25. November 1999 (1999-11-25) Beschreibung Beispiele 22-26 —	1-4, 15-17 —/—

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen in Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- \*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- \*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17. August 2001

24/08/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

—  
de Nooy, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/04151

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DANIELI ET AL: "Enzyme-mediated regioselective acylations of flavonoid disaccharide monoglycosides" HELVETICA CHIMICA ACTA, CH, VERLAG HELVETICA CHIMICA ACTA, BASEL, Bd. 73, Nr. 7, 1990, Seiten 1837-1844, XP002090940 ISSN: 0018-019X das ganze Dokument -----</p>	1,10,15

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

In nationales Aktenzeichen  
PCT/EP 01/04151

im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19922287 A	25-11-1999	FR 2778663 A JP 2000026263 A US 6235294 B	19-11-1999 25-01-2000 22-05-2001